

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2708168号

(45) 発行日 平成10年(1998) 2月4日

(24) 登録日 平成9年(1997)10月17日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/21			C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02			C 1 2 P 21/02	C
/ C 1 2 N 15/09		9282-4B	C 1 2 N 15/00	A
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:125)				

請求項の数 8 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願昭63-38482	(73) 特許権者	999999999 昭和電工株式会社 東京都港区芝大門1丁目13番9号
(22) 出願日	昭和63年(1988) 2月23日	(72) 発明者	崎元 和範 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電 工株式会社生化学研究所内
(65) 公開番号	特開平1-215280 ✓	(72) 発明者	高橋 薫 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電 工株式会社生化学研究所内
(43) 公開日	平成1年(1989) 8月29日	(72) 発明者	矢島 善博 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電 工株式会社生化学研究所内
		(72) 発明者	久留 由美子 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電 工株式会社生化学研究所内
		(74) 代理人	弁理士 青木 朗 (外4名)
		審査官	植野 浩志

(54) 【発明の名称】 微生物の改良

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 目的物質の生産に係わる遺伝子(目的遺伝子)を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該目的遺伝子のための発現制御配列が、該目的遺伝子の発現を制御することができる位置及び方向で導入されている改良された微生物であって、前記発現制御配列が、該発現制御配列の一端又は両端に付加された前記目的遺伝子のDNA配列の部分と相補的な配列による相同的交叉により導入されたものであることを特徴とする微生物。

【請求項2】 前記微生物がバチルス(Bacillus)属微生物である請求項1に記載の微生物。

【請求項3】 前記微生物がバチルス・ズブチリス(Bacillus subtilis)又はバチルス・アミロリクエファシエンス(Bacillus amyloliquefaciens)である請求項2に記載の微生物。

2

【請求項4】 前記発現制御配列がプロモーターであり、該プロモーターが前記遺伝子上流に挿入されている、請求項1〜3のいずれか1項に記載の微生物。

【請求項5】 該プロモーターがバチルス属微生物のプロモーター又は、バチルス属微生物のファージのプロモーターであり、該プロモーターが前記遺伝子上流に挿入されている、請求項4に記載の微生物。

【請求項6】 前記遺伝子がトリプトファンの合成に係る遺伝子である請求項1〜5のいずれか1項に記載の微生物。

【請求項7】 目的物質の生産に係わる遺伝子(目的遺伝子)を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該目的遺伝子のための発現制御領域を、該目的遺伝子の発現を増強することができる位置及び方向で導入することを特徴とする改良された微生物の製造方法において、前

記発現制御配列を、該発現制御配列の一端又は両端に付加された前記目的遺伝子のDNA配列の部分と相補的な配列による相同的交叉により導入することを特徴とする方法。

【請求項8】特許請求の範囲第1項に記載の微生物を培養して該遺伝子に係わる生成物を生産せしめ、そして該生成物を採取することを特徴とする有用物質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明は有用微生物の新規な改良方法及び該改良方法により製造された微生物、並びに該微生物を用いる有用物質の製造方法に関する。本発明の微生物の改良方法は、既存の遺伝子を含有する染色体に、該遺伝子の発現を制御することができる発現制御配列を外から導入することを特徴とする。

【従来の技術】

組換えDNA技術の発展、進歩によってホルモン、ワクチン、インターフェロン等の蛋白質や酵素、アミノ酸、さらにビタミンや抗生物質などの二次代謝産物に至るまで、微生物中で大量生産が可能となった。これは、物質生産に係わる特定の遺伝子を適当な多コピー数のプラスミドベクター上にクローン化し、該プラスミドを適当な微生物中に形質転換法で導入し、物質生産に係わる導入した遺伝子を発現させることにより達成される。この際、活性の高いプロモーター遺伝子を有するプラスミドベクターを用いて、プロモーター遺伝子と目的遺伝子を機能的に連結することにより、遺伝子の発現はより効率的に行われる。しかしながら、プラスミドの脱落が起こったり、プラスミドに変異や欠失が生じる等の為、プラスミドベクターを用いた物質生産は一般的に不安定であり安定的な物質生産には不適当なことがある。

これに代る方法として、宿主微生物の染色体に目的遺伝子をインテグレーションせしめる方法があり、この方法によれば外部から導入された遺伝子を多世代にわたって安定に維持することができるが、該遺伝子の増幅度を上げることが困難であり、このため目的とする生成物の生産性に限界があるという欠点が存在する。

【発明が解決しようとする課題】

従って、目的の物質に係る遺伝子が染色体に安定に維持されており、しかも該遺伝子が強力に発現され、目的物質を効率よく生産することができる微生物及びその創成方法が強く求められている。

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上記の問題点を解決すべく種々検討した結果、特定の目的物質の生産に係わる遺伝子をすでに含有する微生物染色体に、該遺伝子の発現を増強することができる強力なプロモーターを導入することにより、目的物質を効率よく生産することができる微生物が得られることを見出し、この発明を完成した。

従って、本発明は、目的物質の生産に係わる遺伝子（目的遺伝子）を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該目的遺伝子のための発現制御配列が、該目的遺伝子の発現を制御することができる位置及び方向で導入されている改良された微生物であって、前記発現制御配列が、該発現制御配列の一端又は両端に付加された前記目的遺伝子のDNA配列の部分と相補助的な配列による相同的交叉により導入されたものであることを特徴とする微生物；目的物質の生産に係わる遺伝子（目的遺伝子）を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該目的遺伝子のための発現制御領域を、該目的遺伝子の発現を増強することができる位置及び方向で導入することをも特徴とする改良された微生物の製造方法において、前記発現制御配列を、該発現制御配列の一端又は両端に付加された前記目的遺伝子のDNA配列の部分と相補助的な配列による相同的交叉により導入することを特徴とする方法；並びに、該微生物を培養して該遺伝子に係る生成物を生産せしめ、そして該生成物を採取することを特徴とする有用物質の製造方法、を提供しようとするものである。

【具体的な説明】

本発明は、目的物質の生産に係る遺伝子をすでにその染色体中に有し該目的物質を生産することができる微生物、及び目的物質の生産に係る遺伝子をすでにその染色体中に有するが該目的物質を実質上生産することができず新たに外部から発現制御遺伝子を導入することにより該目的物質を生産することができる様になる微生物、のいずれにも適用することができる。このような微生物として、例えばバチルス（*Bacillus*）属、エシェリシア（*Escherichia*）属、セラチア（*Serratia*）属、シュードモナス（*Pseudomonas*）属、ブレヴィバクテリウム（*Brevibacterium*）属、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）属等属する微生物を挙げることができる。バチルス属に属する微生物の例として、例えばバチルス・ズブチリス、バチルス・アミロリクエファシエンシス、バチルス・リケニホルミス、バチルス・ステアロサーモフィラス等を挙げることができる。

本発明の方法により製造される目的物質は、遺伝子の直接的な発現生成物である蛋白質又はポリペプチド、例えば各種の酵素類、例えばプロテアーゼ、アミラーゼ、グルコースイソメラーゼ、セルラーゼ、トリプトファンシンセターゼ；各種のペプチド性ホルモン類、例えばインシュリン、成長ホルモン、エンケファリン、ソマトスタチン；各種の抗原類、例えば肝炎ワクチン、ポリオワクチン、ヘルペスワクチン；各種のリンホカイン類、例えばインターフェロン、インターロイキン等であることができる。

本発明の方法により製造される目的物質はまた、遺伝子の直接的発現生成物である1又は複数の酵素の触媒作用により生産される物質であることができる。この様な

物質の例として複数のトリプトファン合成関連酵素により合成されるL-トリプトファン、複数のスレオニン合成関連酵素により合成されるL-スレオニン、複数のプリンヌクレオチド合成酵素により合成されるイノシンやグアニン等を挙げることができる。このような目的物質の生産に係わる遺伝子としては、宿主微生物の染色体中に本来存在する遺伝子であってもよく、又あらかじめ宿主微生物の染色体中に人為的に挿入しておいた遺伝子であってもよい。前者の遺伝子はその遺伝子に天然に付随する発現制御配列を有しており、これに加えて本発明の方法により追加の発現制御配列を挿入することにより、宿主による目的物質の生産を増強することができ、あるいはもともと目的物質を実質的に生産しなかった宿主に目的物質を生産する能力を付与することができる。後者の場合も、多く場合その構造遺伝子に付随する発現制御領域を有しており、本発明の方法による強力な発現制御配列を導入することにより、前記のごとき効果を得ることができる。あらかじめ挿入された遺伝子とその発現制御配列を伴っていない場合には、そのまま宿主微生物は目的物質を生産することができないが、本発明の方法により発現制御配列を人為的に挿入することにより該宿主微生物に目的物質を生産する能力を付与することができる。この様は遺伝子を含有する微生物の具合例として、枯草菌類のトリプトファン合成に係わる遺伝子とクロラムフェニコール耐性遺伝子を試験管内でライゲーションせしめ、トリプトファン生産菌である若草菌類の染色体中に両遺伝子をインテグレーションさせることにより創製された、安定的に両遺伝子産物及びトリプトファン生産する微生物が挙げられる（特開昭61-85184、及び特開昭61-88873）。

発現制御配列としては例えばプロモーター、ターミネーター、SD配列、オペレーターが挙げられ、これらは特定の発現制御配列に依存して通常は染色体にあらかじめ存在する、目的物質の生産に係わる構造遺伝子の^{上流又は下流に、該構造遺伝子の転写方向に合わせて挿入される。}前記制御配列の典型的な例はプロモーターであり、これは一般に前記構造遺伝子の^{上流に該構造遺伝子の転写方向に合わせて挿入される。}例えば、ある特定の宿主微生物については、該微生物中に天然に存在するプロモーターをクローン化したもの、又は該微生物のファージ中に天然に存在するプロモーターをクローン化したもの、あるいはこれらのプロモーターに由来するハイブリッドプロモーター等を使用することができる。プロモーターはまた、化学合成されたものであってもよい。

挿入すべき発現制御領域は通常、宿主微生物中で増幅することができるプラスミドにより、あるいは宿主微生物中で増幅することができない環状又は線状のDNAとして導入される。目的とするDNAを宿主微生物に導入するための方法として、DNAを細胞に挿入するために通常用いられる方法のいずれか、例えばカルシウムセル法（文

献J. Bacteriol., 119, 1072 (1974)）、コンピテントセル法（文献Gene, 1, 153 (1977)）、プロトプラスト形質転換法（Molec. Gen. Genet. 168, 111 (1977)）等を用いることができる。

プロモーター等の発現制御配列を宿主微生物の染色体にインテグレーションする方法としては一般に、いわゆる相同的交叉が用いられる。このため、挿入されるべき制御配列はその一端又は両端に、染色体にすでに存在している目的生成物の生産に係わる遺伝子のDNA配列と相同なDNA配列を有することが好ましい。

本明細書においては、具体例として、宿主微生物としてバチルス・アミロリクエファシエンスを用い、目的物質の生産に係わる遺伝子としてトリプトファンオペロンを構成する遺伝子を用い、発現制御配列としてバチルス・アミロリクエファシエンス由来のプロモーター又はバチルス・ズブチリスに感染するSP02ファージ由来のプロモーターを用いる。以下に、この具体例を実施例として記載する。

なお、実施例において酵素反応条件はおよそ次の通りとした。

Hind III消化

反応媒体: 100mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM NaCl, 5mM MgCl₂

酵素量 : DNA1 μ g に対して5ユニット

反応条件: 37℃にて60分間

Hind III部分消化

反応媒体: 100mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM NaCl, 5mM MgCl₂

酵素量 : DNA1 μ g に対して0.1ユニット〜1ユニット

30 ト

反応条件: 37℃にて60分間

Sma I 消化

反応媒体: 10mM Tris-HCl (pH8.0), 20mM KCl, 7mM MgCl₂

酵素量 : DNA1 μ g に対して10ユニット

反応条件: 37℃にて60分間

Xba I 消化

反応条件: 100mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM NaCl, 5mM MgCl₂

40

酵素量 : DNA1 μ g に対して5ユニット

反応条件: 37℃にて60分間

EcoR I消化

反応媒体: 100mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM NaCl, 5mM MgCl₂

酵素量 : DNA1 μ g に対して5ユニット

反応条件: 37℃にて60分間

BamH I消化

反応媒体: 100mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM NaCl, 5mM MgCl₂

50

酵素量 : DNA1 μ g に対して10ユニット

体が取得された。

この様にして、相同的交叉によりプロモーターP756が染色体上のトリプトファン合成系遺伝子のすぐ上流にインテグレーションされ、目的とするトリプトファン生産株が得られた。この相同的交叉の結果を第2図に模式的に示す。

例3. (参考例) ファージSP02由来のプロモーターとトリプトファン合成系遺伝子を含有するプラスミドの調製及びその宿主への導入 (第3図)

第3図に示す出発プラスミドpSDB 136は、枯草菌ファージSP02由来のプロモーター (P201) を含有する0.17MDのEcoR Iフラグメントを含有し、その下流に制限酵素切断点BamH I, Sal I及びPst Iを含み、さらにその下流にバチルス・プミルス (*Bacillus pumilus*) 由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子の構造遺伝子を含有する5MDの大きさのプラスミドである。該プラスミドはpRL708 (Gene, 16, 199 (1981)) (*Bacillus Genetic Stock Center*, オハイオ・ステート・ユニバーシティーから商業的に入手することができる。) をEcoR IとBgl IIで消化し、EcoR IとBamH Iで消化したpBR322と混合、T4 DNAリガーゼで結合反応後、大腸菌c600に形質転換を行ない、得られたクロラムフェニコール耐性の形質転換体から調製される。

プラスミドpSDB 136を制限酵素BamH Iで消化し、次に大腸菌DNAポリメラーゼのKlenowフラグメントで処理した。他方、プラスミドpSDT 111を制限酵素EcoR Iで消化し、次に大腸菌DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントで処理した。両DNA断片を混合した後、T4 DNAリガーゼにより連結し、この生成物を用いてトリプトファン要求性大腸菌JA 221を形質転換した。得られたトリプトファン非要求性、アンピシリン耐性でかつクロラムフェニコール耐性の形質転換体よりプラスミドを抽出、分析してSP02ファージ由来プロモーターとトリプトファン合成系遺伝子を含むフラグメントが機能的に連結している大きさ10MDの組替えプラスミドpSEY1213が得られた。

このプラスミドpSEY1213を用い、実施例1に記載したのと同様にしてバチルス・アミロリクエファシエンスのトリプトファン生産株バチルスSD-30のコンピテントセルを形質転換した。こうして、相同的交叉によりプロモーターP201が染色体上のトリプトファン合成系遺伝子のすぐ上流にインテグレーションされ、目的とするトリプトファン生産株が得られた。この相同的交叉の結果を第3図に模式的に示す。

実施例4. トリプトファン合成系酵素類の発現

細菌染色体上のトリプトファン遺伝子近傍に、プロモーター配列を挿入した菌株バチルスSD1034、及びバチルスSD1035の生産する酵素トリプトファンシンセターゼおよびアントラニール酸シンセターゼの量を同酵素の活性測定により測った。

プロモーターの導入されていない親株バチルスSD30、

並びにプロモーターが導入されている株バチルスSD1034、及びバチルスSD1035をTBAB寒天培地 (Difco社) で前培養し、Spizizen最少培地100mlにOD (660nm) が約0.03になるように接種し、37℃でOD (660nm) が約0.5になるまで振とう培養した。5000rpm、15分間冷却遠心を行い、沈澱をバッファーI (0.025M KH_2PO_4 、0.075M K_2HP 0₄, pH7.3, 0.01M L-グルタミン、10%グリセリン) で洗浄遠心後、2mlのバッファーII (0.025M KH_2PO_4 、0.075M K_2HP 0₄, pH7.3, 0.01M L-グルタミン、4mM MgCl_2 、40%グリセリン) に懸濁した。リゾチーム0.5mg、DNase5 μg 添加し、37℃で30分間インキュベーションした。30,000rpmで、30分間遠心し上清を粗酵素液とした。

Method in Engymolgy, 5, 794 (1962) に従って行ったトリプトファンシンセターゼ活性測定の結果、およびGenetics, 52, 1303 (1965) に従って行ったアントラニール酸シンセターゼ活性測定の結果を示す。

菌株	トリプトファンシンセターゼ活性	アントラニール酸シンセターゼ
SD30	100	100
SD1034	250	300
SD1035	300	320

バチルスSD1034においては、P756プロモーター及びアントラニール酸シンセターゼ遺伝子を含有するトリプトファン合成系遺伝子の上流部分が宿主細菌の染色体上のトリプトファン合成系遺伝子の近傍に導入されており、この結果として染色体上に元から存在したトリプトファン合成系の遺伝子の発現が強化されていると共に、追加のアントラニール酸シンセターゼ遺伝子が導入されている。このため、トリプトファンシンセターゼ活性が約2.5倍に増強され、アントラニール酸シンセターゼ活性は約3.0倍に増強された。他方、バチルスSD1035においては、トリプトファン合成系遺伝子の2倍体が形成されており、さらにその片方のトリプトファン合成系遺伝子近傍にP201プロモーター配列DNAが導入されていることにより、アントラニール酸シンセターゼ活性、及びトリプトファンシンセターゼ活性が3~3.2倍増強された。

実施例5. L-トリプトファンの製造

グルコース5%, 硫酸0.2%, K_2HPO_4 1.4%, KH_2PO_4 0.6%, クエン酸ナトリウム $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1ppm, MnSO_4 1ppmを含む培地 (pH7.0) 2Lにアントラニール酸800ppmを添加し、これにプロモーターの導入されていない親株バチルスSD30、並びにプロモーターが導入された株バチルスSD1034、及びバチルスSD1035を接種し、35℃で5Lのジャーファメンターで通気攪はん培養した。培養中、アントラニール酸濃度が50ppm以下まで減少した時点でアントラニール酸濃度が約1000ppmになるように適宜追加添加し、また培養途中グルコースを100g追加し、更にアンモニア水の添加により培地のpHを7.0±0.4に保ちながら15時間培養した。培養液中に

蓄積されたL-トリプトファンの量を高速液体クロマトグラフィーにより測定した結果を下に示す。

菌株	L-トリプトファン蓄積(g/L)
SD30	4.7
SD1034	8.9
SD1035	15.1

上の表から明らかな様に、本発明のプロモーターの導入によって染色体上のトリプトファン合成系遺伝子の発現が増強されたバチルスSD1034は親株SD30に比べて約2倍のトリプトファンを蓄積した。他方、プロモーターのほかに追加のトリプトファン合成系遺伝子が導入されたバチルスSD1035は親株SD30に比べて約3倍のトリプトファンを蓄積した。

実施例6.

バチルスSD1034、及びバチルスSD1035に於いてプロモーター配列DNAがトリプトファン遺伝子の近傍に導入されていることは次の様なサザンハイブリダイゼーション法により確認した。

バチルスSD1034、及びバチルスSD1035を100mlで35℃、1夜振とう培養して、通常のDNA抽出法(Biochem. Biophys. Acta 72, 619, (1963))により染色体DNAを抽出・精製し約1mgを得た。各DNA1μgずつを制限酵素BamH I、EcoR I、Xba Iで夫々完全に消化し、アガロース電気泳動を行った。常法に従ってアルカル変性、中和後、ニトロセルロースフィルターにDNAをトランスファーした。フィルターを洗浄後、80℃で2時間熱処理した。

プローブDNAとして別に精製したトリプトファン遺伝子を含む5MDのEcoR IフラグメントとP756プロモーターを含む0.3MDのHind IIIフラグメントとP201プロモーターを含む0.18MDのEcoR Iフラグメントをニックタロンスレーション法により〔γ-³²P〕dCTPでラベルして比活性40μCi/100ngのプローブDNAを作製した。

前述のフィルターをブレイハイブリダイゼーション溶液(6×SSC、5×デンハルト溶液中で42℃2時間インキュベーションの後40μCiのプローブDNAと50%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液(6×SSC、2×デンハルト溶液中で42℃1夜インキュベーション)した。次にフィルターを2回、37℃で15分間緩衝液(2×

SSC) 中でインキュベーションし低塩濃度の緩衝液(0.1×SSC)に移し、2回、37℃で5分間洗浄した。フィルターの水分を拭きとりコダックXAR5フィルムを用いて-80℃で3時間オートラジオグラフィーを行った。

その結果、バチルスSD1034の場合、BamH Iで消化した7MDの大きさ付近にトリプトファン遺伝子を含むフラグメントプローブでも、P756を含むフラグメントプローブでもシグナルが生じた。又、EcoR Iで消化した4.3MDの大きさ付近にトリプトファン遺伝子を含むフラグメントプローブでもP756を含むフラグメントプローブでもシグナルが生じ、更にXba Iで消化した、4.3MDの大きさ付近にもトリプトファン遺伝子を含むフラグメントプローブでもP756を含むフラグメントプローブでもシグナルが生じた。従ってバチルスSD1034のトリプトファン遺伝子付近の構造は第2図のようであり、プロモーター配列がトリプトファン遺伝子の近傍に導入されていることが確認された。

バチルスSD1035の場合、Xba Iで消化した10MDの大きさ付近にトリプトファン遺伝子を含むフラグメントプローブでもP201を含むフラグメントプローブでもシグナルが生じ、相同的交叉の結果、第3図に示すように、プロモーター配列がトリプトファン遺伝子の近傍に導入されていることが確認された。

【本発明の効果】

本発明に従えば、プラスミドを用いた遺伝子増幅と異なり、安定的に微生物の生産する特定の物質を多量に工業的に生産することが可能となる。さらに遺伝子増幅に於いては、目的の遺伝子が完全無傷でないとその目的を達成することができないが、本発明では目的遺伝子の上流部分と任意のプロモーターDNAさえあれば、簡単にその目的が達成される。

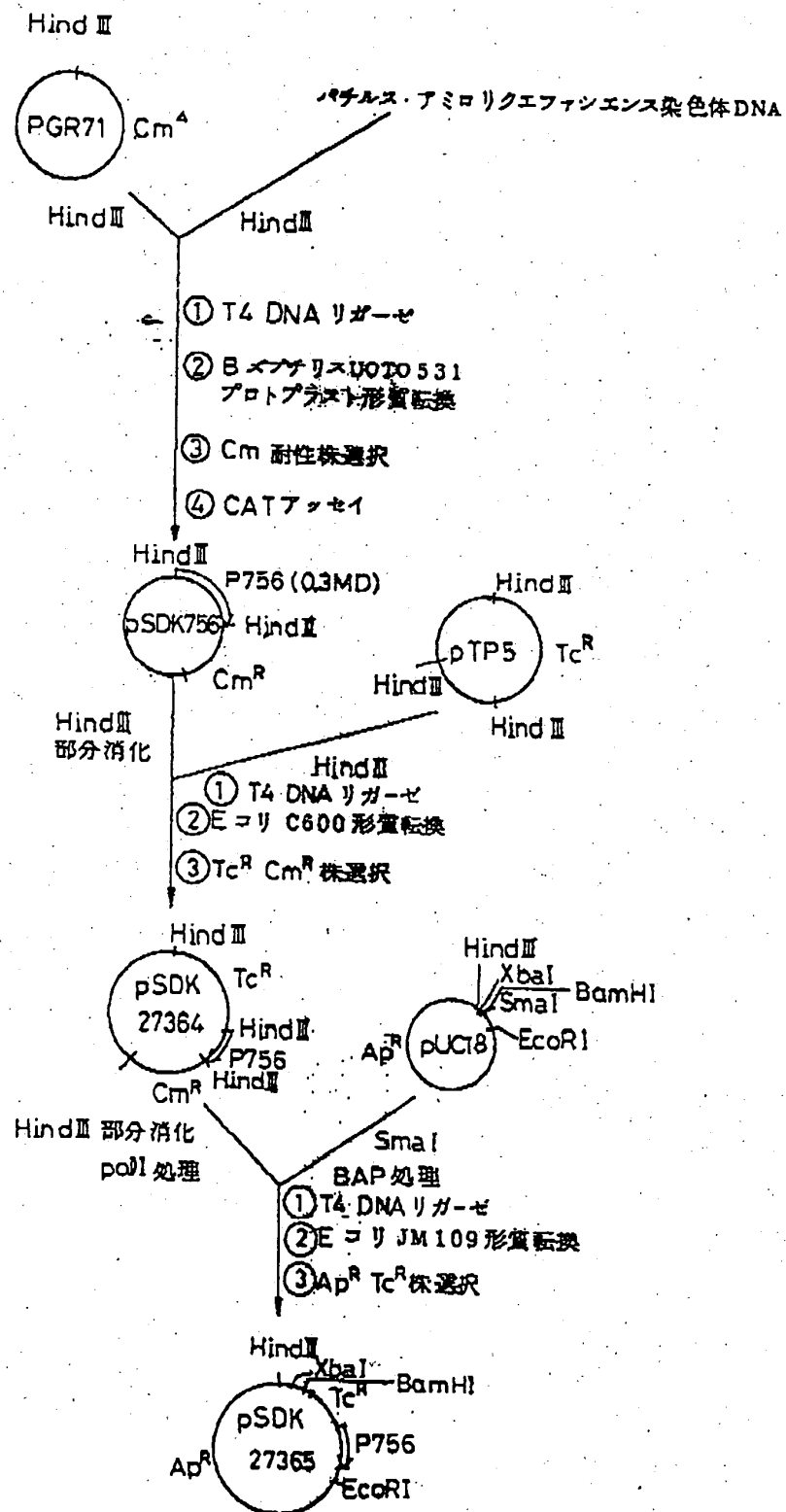
【図面の簡単な説明】

第1図は、プロモーター配列DNAのクローニング方法を示す。

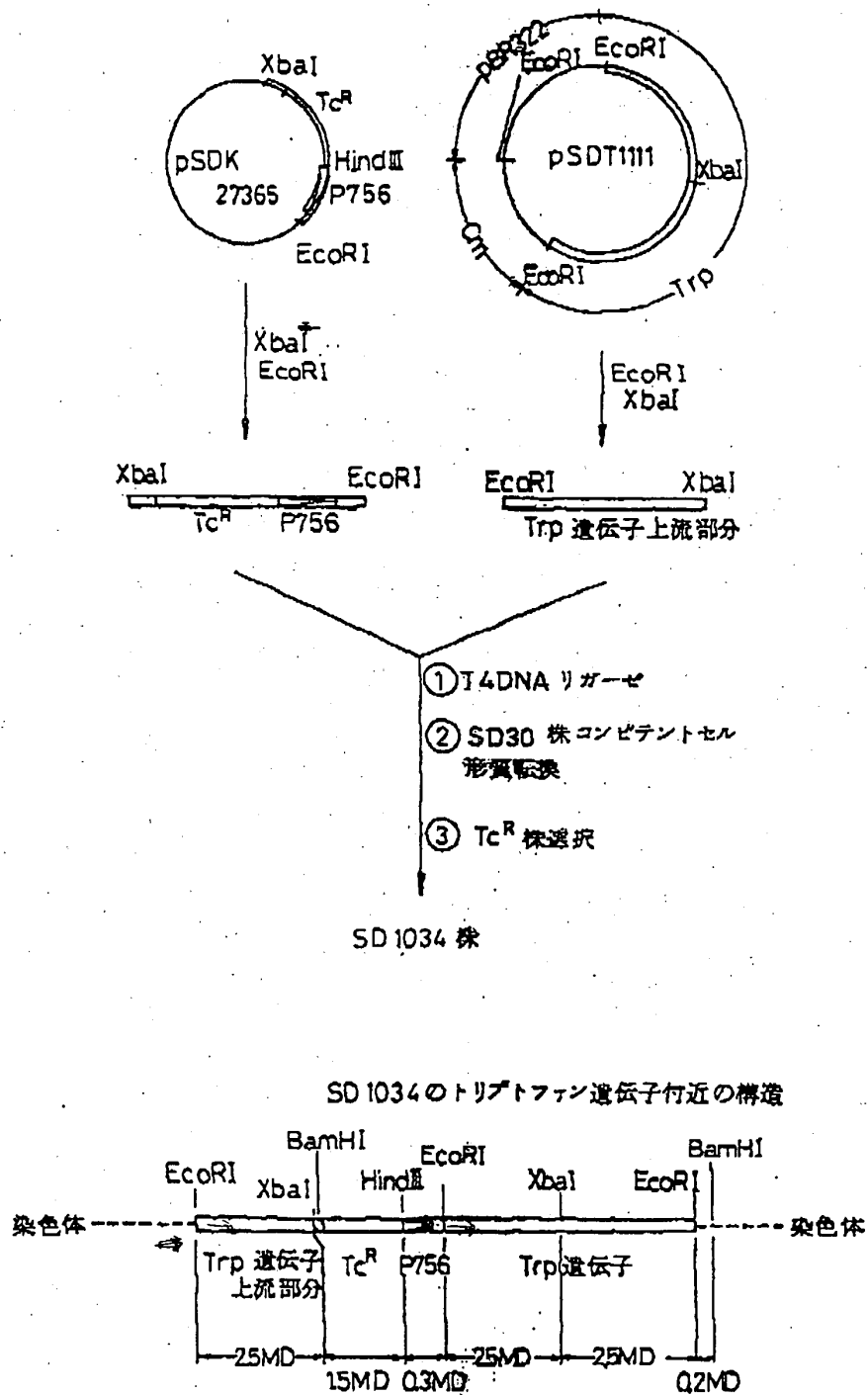
第2図は、プロモーター配列DNAとトリプトファン遺伝子上流部分の細菌への導入方法を示す。

第3図は、プロモーター配列下流へトリプトファン遺伝子が組み込まれたDNAの調製法、及び細菌への導入方法を示す。

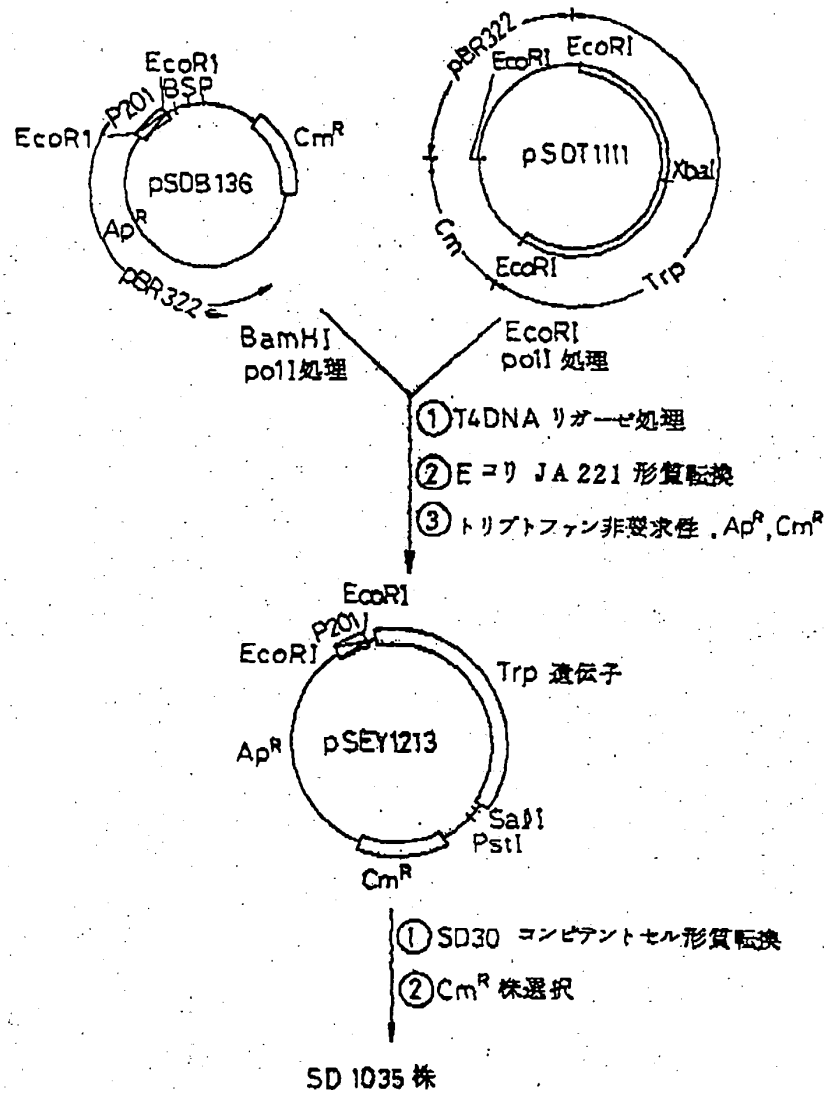
【第1図】



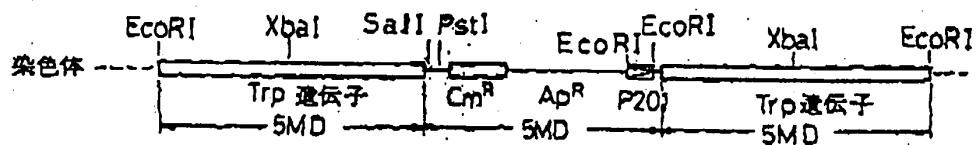
【第2図】



【第3図】



SD 1035 のトリプトファン遺伝子付近の構造



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:07)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:125)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:07)